

Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Serbuk Gergaji Kayu Eboni (*Diospyros celebica* Bakh.) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*

Wahyuni^{1*)}, Nurlina Ibrahim², Arsa Wahyu Nugrahani²

¹Jurusan Farmasi, FMIPA, Universitas Tadulako, Palu, 94118, Indonesia

²Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Farmasi, FMIPA, Universitas Tadulako, Palu, 94118, Indonesia

Email : Wahyuni008@gmail.com

ABSTRACT

Ebony (*Diospyros celebica* Bakh.) is one of the beneficial plants from ebenaceae, especially in traditional medicine. The sawdust extract containing chemical compounds such as tannins, saponins and terpenoids. This research were aimed to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) also to identified the active compounds from sawdust extracts of *D. celebica* Bakh. against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The Research methods include extraction using maceration method by ethanol 96%. MIC and MBC determination using dilution and diffusion methods. The Results showed that MIC value of *S. aureus* and *E. coli* were 6% and 7%, respectively. While MBC value of *S. aureus* and *E. coli* were 12% and 13%, respectively. Identification of chemical compounds were determined by Thin Layer Chromatography (TLC) bioautography method by 10% H₂SO₄ and anisaldehyd-sulfuric acid reagent spray. There were two chemical compounds that produced, saponin and terpenoid.

Keywords: sawdust extract, *Diospyros celebica* Bakh., MIC, MBC, saponin, terpenoid.

PENDAHULUAN

Tanaman dapat menjadi sumber untuk menemukan obat baru. Tanaman sangat terkenal memiliki berbagai macam kegunaan dalam mencegah dan mengobati penyakit. Tanaman adalah sumber yang baik untuk berbagai macam bentuk senyawa metabolit sekunder seperti fenolik, glikosida, saponin, flavonoid, steroid, tanin, alkaloid, dan terpenoid (Sen *et al.*, 2012), memiliki aktivitas antioksidan, antitumor,

antimutagenik, antikarsinogenik, antifungi, dan antibakteri (Malini *et al.*, 2013).

Antibakteri merupakan zat yang dapat menghambat dan membunuh bakteri (Jawetz *et al.*, 2001). Bakteri adalah salah satu agen biologi yang dapat menyebabkan infeksi (WHO, 2014). Penyakit infeksi masih menempati urutan teratas penyebab penyakit dan kematian di negara berkembang, termasuk Indonesia (Wahyono, 2007). Gibson (1991), menjelaskan bahwa infeksi karena bakteri masih mendominasi potensi

terjadinya infeksi berat, sepsis, syok septic, dan disfungsi multiorgan. Kematian di ruang perawatan intensif di Amerika sebanyak 40% disebabkan oleh bakteri Gram positif dan 60% oleh bakteri Gram negatif (Nasronuddin, 2007).

Bakteri Gram positif penyebab infeksi salah satunya adalah *Staphylococcus aureus* dan bakteri Gram negatif adalah *Escherichia coli*. *Staphylococcus aureus* menyebabkan infeksi berupa abses setempat (borok dan jerawat), bakterimia, endokarditis, faringitis, pneumonia (Willey *et al.*, 2008), meningitis, dan empiema (Brooks *et al.*, 2007). *Escherichia coli* merupakan penyebab penyakit diare (Lucyana, 2011), dan penyebab utama Infeksi Saluran Kemih (ISK) (Jawetz *et al.*, 1996).

Eboni (*Diospyros celebica* Bakh.) merupakan salah satu jenis pohon Indonesia mempunyai nilai ekonomi tinggi dan merupakan sumber devisa yang cukup besar (Pitopang dkk., 2009). Berdasarkan hasil analisis kimia secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT) menunjukkan bahwa ekstrak limbah serbuk gergaji kayu eboni mengandung beberapa senyawa metabolit sekunder dari golongan terpenoid, saponin dan tanin (Ramadanil dan Nur, 1997). Keberadaan senyawa terpenoid dalam suatu tanaman dapat bersifat sebagai agen antibakteri (Saleem *et al.*, 2009). Villa dan Patricia (2014) menjelaskan,

senyawa golongan saponin memiliki aktivitas sebagai antijamur dan antibakteri. Menurut Akiyama *et al.*, (2001) tanin memiliki aktivitas antibakteri dengan merusak membran sel bakteri.

Limbah serbuk gergaji kayu eboni kurang dimanfaatkan dimasyarakat, hal ini mendorong peneliti melakukan penelitian tentang penentuan Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimum (KBM) serta penentuan golongan senyawa aktif yang mempunyai aktivitas antibakteri ekstrak serbuk gergaji kayu eboni (*Diospyros celebica* Bakh.) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Farmakognosi-Fitokimia dan Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Tadulako pada bulan Maret 2016 sampai dengan bulan Oktober 2016.

Identifikasi Tumbuhan

Identifikasi tumbuhan dilakukan di Unit Pelaksana Teknis (UPT) Sumber Daya Hayati Sulawesi Universitas Tadulako Palu untuk memastikan tumbuhan yang digunakan adalah kayu hitam (*Diospyros celebica* Bakh.).

Preparasi Sampel

Sampel serbuk gergaji kayu eboni diperoleh dari pengrajin kayu eboni

(belum mengalami proses pengolahan apapun) di pantoloan. Sampel tersebut dikumpulkan, dicuci bersih dan dikeringkan dengan cara dianginkan dalam ruangan yang memiliki sirkulasi udara baik dan tidak terkena sinar matahari secara langsung.

Ekstraksi Serbuk Gergaji Kayu Eboni

Sampel serbuk gergaji kayu eboni kering sebanyak 423,59 gram diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Sampel dimasukkan dalam wadah maserasi dengan 2500 mL pelarut etanol 96%. Setiap 1x24 jam dilakukan pengadukan sebanyak 3 kali. Setelah 3 hari, maserat disaring dan ditampung dalam wadah serta diukur volumenya. Residu awal dilakukan remaserasi kembali sebanyak 2 kali dengan pelarut sama dan baru sebanyak 2500 mL. Ekstrak cair hasil maserasi tersebut dengan perlakuan yang sama digabungkan dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator*. Ekstrak kental diuapkan pada suhu ruang hingga diperoleh ekstrak kering. Ekstrak kental dan ekstrak kering tersebut ditimbang dan dihitung persen rendemennya.

Pengujian Antibakteri Sterilisasi Alat

Alat-alat logam disterilkan dengan cara dipijarkan menggunakan bunsen, sedangkan untuk alat-alat yang tidak tahan pada pemanasan dengan suhu tinggi, disterilkan dalam autoklaf pada

suhu 121°C, tekanan 2 atm selama 15 menit.

Pembuatan Medium

Pembuatan medium *Nutrient Broth* (NB) dengan cara menyiapkan bahanyaitu menimbang media NB 13 gram dan dilarutkan 1 L aquades dalam erlenmeyer kemudianditutup dengan *aluminium foil*. Suspensi dipanaskan hingga mendidih di atas *hot plate* dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer*. Kemudian disterilkan dalamautoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

Pembuatan medium *Nutrient Agar* (NA) dengan cara menyiapkan bahan yaitu menimbang media NA 29 (yakini?? Media NA merk apa ini?) gram dan dilarutkan 1 L aquades dalam erlenmeyerkemudian ditutup dengan *aluminium foil*. Suspensi dipanaskan hingga mendidih di atas *hot plate* dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer*. Kemudian disterilkan dalamautoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. (paragraf 1 dan 2 bisa diringkas jadi 1 paragraf saja, karena yang membedakan hanya cara membuat media NA dan NB)

Peremajaan Biakan Bakteri

Biakan murni bakteri diremajakan pada media agar dengan cara menggoreskan 1 ose bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichiacoli* secara aseptis pada medianutrient agardalam cawan. Proses tersebut dilakukan di *Laminar Air Flow* (LAF).

Cawan petri ditutup kembali dan inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dalam inkubator.

Pembuatan Suspensi Bakteri

Hasil peremajaan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* kalimatnya terpotong tidak nyambung dengan kalimat berikutnya, sebanyak 1 ose secara aseptis dimasukkan dalam tabung reaksi berisi 5 mL NaCl fisiologis 0,9% dan divortex. (Brock *et al.*, 1991). Suspensi bakteri tersebut dibandingkan dengan standard 0,5 Mc Farland 1 yang menunjukkan kepadatan jumlah koloni bakteri sebanyak $<1,5 \times 10^8$ CFU/mL.

Uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM)

Penentuan nilai KHM mengacu pada metode dilusi dan KBM menggunakan metode difusi. Pertama-tama dibuat stok ekstrak konsentrasi 50% dengan melarutkan 10 gram ekstrak dalam 20 mL DMSO. Kontrol positif ciprofloksasin dibuat dengan melarutkan 250 mg apa? dalam 5 mL medium NB. Kontrol negatif menggunakan pelarut DMSO (berapa banyak DMSO yang digunakan?) dalam 5 mL medium NB. Masing-masing tabung reaksi dimasukkan ekstrak serbuk gergaji kayu eboni, suspensi bakteri serta medium *Nutrient Broth* (NB) dengan konsentrasi (5:2). Proses elusi yang sempurna ditandai dengan sampainya pelarut dibatas yang ditentukan maka dikeluarkan

6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14% dan 15%. Semua tabung uji diinkubasi suhu 37°C selama 24 jam. Diamati kekeruhan suspensi dalam tabung, tabung yang berkurang kekeruhannya dibandingkan dengan kontrol negatif (perlu dijelaskan kondisi tabung yg berisi kontrol negatif dan positif seperti apa) menandakan bahwa terjadi penghambatan pertumbuhan bakteri. Konsentrasi terkecil yang masih dapat menghambat pertumbuhan bakteri uji ditetapkan sebagai KHM. Suspensi dalam tabung diambil satu ose dan ditumbuhkan pada medium *nutrient agar* lalu diinkubasi selama 24 jam. Diamati pertumbuhan bakteri, konsentrasi terendah yang tidak terdapat pertumbuhan bakteri uji ditetapkan sebagai nilai KBM. Konsentrasi tersebut adalah konsentrasi yang bersifat membunuh pertumbuhan bakteri. coba diperbaiki alur metode penentuan KHM dan KBM, kalau perlu dibuatkan sub-bab tersendiri.

Pengujian Aktivitas Antibakteri Ekstrak dengan Metode KLT Bioautografi

Lempeng KLT ukuran 10 x 2 cm dipanaskan dalam oven suhu 110°C selama 10 menit. Ekstrak uji dilarutkan dengan metanol, ditotolkan pada lempeng KLT menggunakan pipa kapiler, dielusi dengan 5 mL eluen *n*-heksana : etil asetat lempeng KLT dan diangin-anginkan. Lempeng yang kering, lalu diamati bercak noda menggunakan sinar UV pada

panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Selanjutnya, dihitung nilai Rf dari masing-masing bercak.

Suspensi bakteri 0,1 mL dimasukkan dalam cawan petri. Tambahkan 10 mL medium NA, dihomogenkan dan dibiarkan pada suhu kamar selama 30 menit. Agar yang memadat dalam cawan petri, diletakkan lempeng KLT berisi bercak noda, dibiarkan pada suhu kamar 30 menit dan lempeng KLT diangkat. Cawan petri berisi biakan bakteri diinkubasi suhu 37°C selama 24 jam. Bercak yang timbul diamati zona hambat (Kumala dkk, 2006).

Tabel 1. Hasil pengujian KHM bakteri *S. aureus*

Konsentra si ekstrak	Kekeruhan	Pertumbuhan bakteri	Ketera ngan
6%	Keruh	Ada	KHM
7%	Keruh	Ada	-
8%	Keruh	Ada	-
9%	Keruh	Ada	-
10%	*Keruh	Tidak ada	-
11%	*Keruh	Tidak ada	-
12%	*Keruh	Tidak ada	-
13%	*Keruh	Tidak ada	-
14%	*Keruh	Tidak ada	-
15%	*Keruh	Tidak ada	-
Kontrol positif	Jernih	Tidak ada	-
Kontrol negatif	Keruh	Ada	-

*Keruh oleh ekstrak

HASIL

Hasil Ekstraksi Serbuk Gergaji Kayu Eboni

Pada proses ekstraksi, simplisia kering serbuk gergaji kayu eboni sebanyak 423,59 gram dilakukan proses ekstraksi menggunakan 2500 mL pelarut etanol 96%. Diperoleh berat ekstrak kental sebanyak 65,09 gram dengan persen

Identifikasi Senyawa Antibakteri dengan Pereaksi Semprot

Lempeng KLT hasil uji KLT bioautografi dilakukan identifikasi golongan senyawa aktif antibakteri menggunakan pereaksi semprot dengan menyemprotkan reagen penampak noda pada lempeng seperti H₂SO₄ 10% untuk deteksi senyawa saponin (Glensk *et al*, 2005) dan pereaksi anisaldehyd-asam sulfat untuk deteksi senyawa terpenoid (Anonim, 1980).

Tabel 2. Hasil pengujian KHM bakteri *E. coli*

Konsentra si Ekstrak	Kekeruhan	Pertumbuh an Bakteri	Keterang an
6%	Keruh	Ada	-
7%	Keruh	Ada	KHM
8%	Keruh	Ada	-
9%	Keruh	Ada	-
10%	*Keruh	Tidak ada	-
11%	*Keruh	Tidak ada	-
12%	*Keruh	Tidak ada	-
13%	*Keruh	Tidak ada	-
14%	*Keruh	Tidak ada	-
15%	*Keruh	Tidak ada	-
Kontrol positif	Jernih	Tidak ada	-
Kontrol negatif	Keruh	Ada	-

*Keruh oleh ekstrak

rendemen 15,37%. Setelah diangin-anginkan dalam ruangan diperoleh berat ekstrak kering 23,33 gram, dengan % rendemen 5,51%.

Hasil Pengujian Kadar Hambat Minimum (KHM) *Staphylococcus aureus*

Hasil pengujian KHM bakteri *S. aureus* (tabel. 1.)

Hasil Pengujian Kadar Hambat Minimum (KHM) *Escherichia coli*

Hasil pengujian KHM bakteri *E. coli* dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 3. Hasil pengujian KBM bakteri *S. aureus*

Konsentrasi Ekstrak	Pertumbuhan Koloni	Keterangan
6%	Ada	-
7%	Ada	-
8%	Ada	-
9%	Ada	-
10%	Ada	-
11%	Ada	-
12%	Tidak ada	KBM
13%	Tidak ada	-
14%	Tidak ada	-
15%	Tidak ada	-

Hasil Pengujian Kadar Bunuh Minimum (KBM) *Staphylococcus aureus*

Hasil pengujian KBM bakteri *Staphylococcus aureus* (tabel 3.)

Hasil Pengujian Kadar Bunuh Minimum (KBM) *Escherichiacoli*

Hasil pengujian KBM bakteri *Escherichiacoli* dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Hasil pengujian KBM bakteri *E. coli*

Konsentrasi Ekstrak	Pertumbuhan Koloni	Keterangan
6%	Ada	-
7%	Ada	-
8%	Ada	-
9%	Ada	-
10%	Ada	-
11%	Ada	-
12%	Ada	-
13%	Tidak ada	KBM
14%	Tidak ada	-
15%	Tidak ada	-

Hasil Pengujian Aktivitas Antibakteri Ekstrak dengan Metode KLT Bioautografi

Hasil KLT bioautografi pada ekstrak menunjukkan aktivitas antibakteri yang

terlokalisasi pada kromatogram ditandai dengan adanya zona hambat pada permukaan media yang terlihat seperti gambar 1.



Gambar 1. Hasil KLT bioautografi terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* (kiri) dan *Escherichia coli* (kanan)

Tabel 5. Hasil visualisasi noda sebelum identifikasi dengan pereaksi semprot

Eluen	Nilai Rf	Warna noda		
		Visual	UV 254	UV 366
n-heksana	0,59	Kuning	Ungu Tua	Hitam
asetat	0,73	Coklat	Ungu Muda	Hitam

Tabel 6. Hasil identifikasi senyawa antibakteri menggunakan pereaksi semprot

Identifikasi Senyawa	Nilai Rf	Warna noda		
		Visual	UV 254	UV 366
Saponin (H ₂ SO ₄ 10%)	0,59	Ungu	Ungu	Hitam
	0,73	Ungu	Ungu Muda	Ungu Kehitaman
Terpenoid (anisaldehid- H ₂ SO ₄)	0,59	-	-	-
	0,73	Merah Kecoklatan	Merah	Hitam

Hasil Identifikasi Senyawa Antibakteri menggunakan Pereaksi Semprot

Hasil identifikasi senyawa aktif antibakteri golongan saponin dan terpenoid menggunakan pereaksi semprot dapat dilihat pada tabel 6.

PEMBAHASAN

Pengambilan sampel dan ekstraksi serbuk gergaji kayu eboni

. Berdasarkan hasil identifikasi di UPT. Sumber Daya Hayati Sulawesi, diketahui bahwa sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah tumbuhan dengan spesies *Diospyros celebica* Bakh. dari *family* Ebenaceae.

Sampel yang telah dikumpulkan, dicuci hingga dikeringkan dalam ruang yang tidak terkena sinar matahari secara langsung untuk menghindari kontak langsung sinar ultra violet yang berakibat buruk terhadap senyawa dalam simplisia. Sampel diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Maserasi merupakan salah satu metode ekstraksi dengan teknik perendaman, yang mekanismenya sebagai berikut, cairan penyari (gunakan padanan kata yang kain) akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif, zat aktif akan larut dan karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan di luar dan di dalam sel sehingga larutan di dalam sel terdesak keluar hingga terjadi kesetimbangan konsentrasi. Pemilihan metode maserasi disebabkan karena metode ini tidak menggunakan proses pemanasan, sehingga senyawa yang tidak tahan terhadap suhu tinggi tidak akan rusak. Selain itu, metode maserasi juga merupakan metode yang mudah digunakan dan murah, karena menggunakan peralatan sederhana dan mudah diperoleh.

Etanol 96% merupakan pelarut yang bersifat polar, dengan harapan bahwa penggunaan pelarut tersebut mampu menghasilkan jumlah bahan aktif yang optimal. Selama proses maserasi berlangsung dilakukan pengadukan setiap 24 jam sebanyak 3 kali agar kontak antara pelarut dan simplisia lebih optimal sehingga kondisi jenuh terlalu cepat dapat dihindari. Maserat yang diperoleh dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 60°C dengan kecepatan 95 rpm. Ekstrak kental yang diperoleh sebanyak 65,09 gram berwarna hitam dan beraroma agak pedis dengan % rendemen 15,37%.

Pengujian Aktivitas Antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri menggunakan metode dilusi untuk menentukan KHM dan difusi untuk menentukan KBM. Penentuan KHM dilakukan dengan beberapa variasi konsentrasi ekstrak. Konsentrasi di atas dipilih berdasarkan hasil orientasi (orientasi apa? Jelaskan lebih detail). Dalam pengujian KHM ini, menggunakan kontrol positif ciprofloksasin. Ciprofloksasin merupakan antibiotik yang memilikispektrum luas yaitu mampu menghambat bahkan membunuh bakteri Gram positif dan Gram negatif. Dosis ciprofloksasin yang digunakan 250 mg. Dosis tersebut mampu membunuh bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* yang ditandai dengan cairan dalam tabung terlihat jernih. Masing-masing

konsentrasi ekstrak yang diambil dari stok 50% dimasukkan dalam tabung yang berisi medium *NB* beserta suspensi bakteri. *NB* adalah medium cair yang cocok digunakan pada metode dilusi tabung sebab kekeruhan dapat teramati secara visual. Selain itu, *NB* termasuk dalam media kompleks yang memiliki kebutuhan nutrisi lengkap bagi pertumbuhan bakteri. Suspensi dalam tabung di inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil pengamatan ini sulit untuk diamati, karena hasil dari pengenceran secara dilusi tabung pada konsentrasi 6% sampai dengan 15%, menunjukkan tingkat kekeruhan yang sama pada semua tabung, hal ini dikarenakan warna dasar dari ekstrak serbuk gergaji eboni adalah hitam. Maka untuk menentukan KHM dan KBM, suspensi dalam tabung dikultur kembali pada media nutrisi agar. Hasil uji KHM ditandai dengan konsentrasi terendah yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* yaitu pada konsentrasi ekstrak 6% (60 mg/ml) dan konsentrasi 7% (70 mg/ml) untuk *Escherichia coli*. Sedangkan hasil pengujian KBM diperoleh konsentrasi terendah yang mematikan bakteri adalah konsentrasi 12% (120 mg/ml) untuk bakteri *S. aureus* dan 13% (130 mg/ml) untuk *E. coli*. Jelaskan detail perbedaan menghambat dan membunuh itu bagaimana!

Dari hasil penelitian ini menunjukkan bahwa Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) pada bakteri *Saureus* lebih kecil dari pada bakteri *E coli* yaitu pada kadar 6% (60mg/ml) dan 7% (70mg/ml). Begitu juga pada Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM), konsentrasi yang dibutuhkan untuk membunuh bakteri *S aureus* yaitu pada kadar 12% (120mg/ml) lebih rendah dari pada bakteri *E coli* yaitu pada kadar 13% (130mg/ml). Perbedaan daya hambat dan daya bunuh ekstrak serbuk gergaji eboni terhadap pertumbuhan koloni bakteri kedua bakteri uji diduga disebabkan karena perbedaan komponen dinding sel bakteri. Bakteri *E coli* merupakan bakteri Gram negatif yang mempunyai struktur dinding sel yang lebih kompleks dan mengandung komponen lipid yang lebih banyak (11-12%) dibandingkan dengan struktur dinding sel pada bakteri *Staphylococcus aureus* (Gram-positif) dengan demikian, dinding sel bakteri *S aureus* lebih mudah rusak oleh senyawa bioaktif yang terdapat pada ekstrak serbuk gergaji eboni. Penghambatan sintesis dinding sel akan menyebabkan dinding sel bakteri diperlemah dan menjadi lisis, lisisnya sel tersebut dikarenakan tidak berfungsi lagi dinding sel untuk mempertahankan bentuk dan melindungi bakteri. Selain itu, bakteri *S aureus* memiliki tekanan osmotik dalam sel 3-5 kali lebih besar daripada bakteri Gram negatif, sehingga lebih mudah mengalami

lisis(Jawetz, *et al.*, 2005). Perbedaan nilai KHM dan KBM pada bakteri *S aureus* dan *E coli* disebabkan karena konsentrasi 6% dan 7% belum mampu merusak secara optimal komponen dinding sel bakteri sementara pada konsentrasi 12% dan 13% mampu merusak struktur dinding sel sampai ke lapisan paling dalam sel serta mempengaruhi permeabilitas membran sel bakteri sehingga bakteri mati.

Pengujian Aktivitas Antibakteri Menggunakan KLT Bioautografi

KLT bioautografi merupakan salah satu metode dalam pengujian antibakteri dengan prinsip kerja melokalisasi aktivitas senyawa pada suatu kromatogram dan melihat zona hambat yang terbentuk pada media agar (Djide, 2008). Pengujian ini dilakukan menggunakan lempeng KLT yang telah dielus dengan eluen *n*-heksana : etil asetat (5:2). Pemilihan eluen tersebut dipilih berdasarkan hasil orientasi eluen yang terbaik. Perbandingan *n*-heksana : etil asetat (5:2) memberikan pemisahan terbaik, hal ini dapat dilihat dengan adanya noda yang terpisah dengan baik dan jumlah noda terbanyak yaitu 2 noda. Adapun hasil pengujian aktivitas antibakteri dengan metode KLT bioautografi dari ekstrak serbuk gergaji kayu eboni diperoleh dua noda yang menghambat pertumbuhan bakteri kedua bakteri uji yaitu noda I dan II dengan nilai *Rf* masing-masing adalah 0,59 dan 0,73. Nilai *Rf* digunakan untuk melihat

adanya perbedaan senyawa dalam ekstrak. Senyawa yang memiliki nilai *Rf* besar mengindikasikan bahwa senyawa tersebut memiliki kepolaran yang kecil.

Identifikasi Senyawa Antibakteri dengan Pereaksi Semprot

Proses identifikasi senyawa antibakteri dilakukan menggunakan reagen penampak noda dengan menyemprotkan pereaksi semprot yang spesifik. Identifikasi senyawa golongan saponin dideteksi menggunakan pereaksi semprot asam sulfat (H_2SO_4 10%). Penggunaan pereaksi tersebut karena sifatnya yang asam sehingga dapat digunakan untuk menampakkan noda yang tidak tampak. Asam sulfat memiliki sifat mengoksidasi sehingga jika noda yang tidak tampak pada lampu UV maka akan tampak pada penyemprotan H_2SO_4 , ini terjadi karena struktur dari komponen kimianya dipecah sehingga ikatan berubah. Pereaksi anisaldehyd-asam sulfat untuk mendeteksi senyawa golongan terpenoid dengan mengoksidasi senyawa pada lempeng KLT. Dari hasil identifikasi tersebut, noda I dengan nilai *Rf* 0,59 pada plat yang disemprot asam sulfat 10% memberikan warna ungu secara visual dan sinar UV tampak berwarna ungu, hal ini bahwa noda tersebut diduga senyawa golongan saponin. Senyawa golongan saponin memiliki gugus aglikon (senyawa bukan gula) yang berperan sebagai antibakteri. Menurut (Villa, 2014), mekanisme kerja saponin dapat

mengubah permeabilitas sel dan mengganggu permeabilitas membran sel bakteri. Sedangkan plat yang disemprot dengan pereaksi anisaldehyd-asam sulfat, noda II memberikan warna merah yang berarti bahwa noda tersebut merupakan golongan terpenoid. Terpenoid memiliki gugus hidroksil dan bersifat hidrofilik. Terpenoid bereaksi dengan porin pada membran luar dinding sel bakteri, membentuk ikatan polimer yang kuat sehingga mengakibatkan rusaknya porin. Rusaknya porin yang merupakan pintu keluar masuknya senyawa akan mengurangi permeabilitas dinding sel bakteri yang mengakibatkan sel bakteri kekurangan nutrisi, sehingga pertumbuhan bakteri terhambat atau mati (Cowan, 1999).

DAFTAR PUSTAKA

- Akiyama, H., Fujii, K., Yamasaki, O., Oono, T., and Iwatsuki, T., 2001, *Antibacterial Action of Several TannisAgaints Staphylococcus aureus*. Journal of Antimicrobial Chemoterapy, Vol. 48:487-491.
- Brock, T.D., Madigan, M.T., Martinko, J.M., and Jack, P., 1991, *Biology OfMicroorganisms Seven Edition*, Prentice Hall, Englewood Cliffs, NewJersey, p. 571-572.
- Cowan, M., 1999, *Plant Product as Antimicrobial Agent*, Clinical Microbiology Reviews, Vol 12 : 564-582.
- Gibson, J.M., 1991, *Mikrobiologi dan Patologi Modern Untuk Perawat*, EGC, Jakarta.
- Jawetz, E., Melnick, J.L., dan Adelberg, E.A., 1996, *Mikrobiologi Kedokteran Edisi 20*,EGC, Jakarta.
- Jawetz, E., Melnick, J. L., dan Adelberg, E. A., 2001, *Mikrobiologi Kedokteran*, Edisi 22, diterjemahkan oleh Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Penerbit Salemba Medika, Jakarta.
- Kumala, Shirly, Risma Marisi Tambunan, dan Dede Mochtar, 2006, *Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Kembang Pukul Empat (Mirabilis jalapa L.) dengan Metode Bioautografi*, Jurnal Farmasi Indonesia Vol.3 No.2 :78-83.
- Lucyana, 2011, *Uji Efektivitas Senyawa Flavonoid dari Ekstrak Daun Beluntas (Pluchea indica Less.) Sebagai Antibakteri Eschericia coli Penyebab Penyakit Diare*, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Tadulako, Palu.
- Malini, M., G. Abirami, V. Hemalatha, dan G. Annadurai, 2013, *Antimicrobial Activity of Ethanolic and Aqueous Extracts of Medicinal Plants Against Waste Water Pathogens*, International Journal of Research in Pure and Applied Microbiology, 3(2):40-42.
- Nasronuddin, 2007, *Penyakit Infeksi di Indonesia Solusi Kini dan Mendatang*, Airlangga University Press, Surabaya.
- Pitopang, R., Khairuddin, I., Tjoa, A., dan Burhanudin, I., 2009, *100 Pohon-Pohon Khas Sulawesi*, UNTAD Press, Palu.
- Ramadhanil dan Nur, A., 1997, *Potensi Ekstrak Limbah Serbuk Gergaji Kayu Eboni (Diospyros celebica Bakh.) Sebagai Pestisida Botani Untuk Mengendalikan Hama Helopelthis antonii sign*, Lembaga Penelitian Universitas Tadulako, Palu.
- Sen, A., dan A. Batra, 2012, *Evaluation of Antimicrobial Activity of Different Solvent Extracts of Medicinal Plant. Melia azedarach L.*, International Journal of Current Pharmaceutical Research, Vol 4(2):67-73.
- Sudewo, B., 2005, *Basmi Penyakit dengan Sirih Merah*, Agromedia Pustaka,Jakarta.
- Villa, T.G., and Patricia, 2014, *Antimicrobial Compound*, Spinger, Berlin.

Wahyono, H., 2007, *Peran Mikrobiologi Klinik pada Penanganan Penyakit Infeksi*, Makalah Pidato Pengukuhan Guru Besar dalam Ilmu Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.

WHO, 2014, *Indonesia : Health Profile*, WHO Technical Report Series.

Willey, J.M., L.M. Sherwood, and C.J. Woolverton, 2008, *Prescott, Harley, and Klein's Microbiology, Seventh Edition*, The Mc Graw-Hill Companies, Inc, New York.